

Università degli Studi di Pisa



Facoltà di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA:

“Influenza di nuovi enhancers e di tecniche fisiche (microaghi)  
sulla permeazione e distribuzione cutanea di farmaci”

**RELATORI:**

Dott.ssa Daniela Monti  
Dott. Emanuele Egiziano

**CANDIDATA:**

Linda Benedetti

Anno Accademico 2010-2011

*Il contenuto di questa tesi di laurea è strettamente riservato, essendo presenti argomenti tutelati dalla legge come segreti. Pertanto, tutti coloro che ne prendono conoscenza sono soggetti all'obbligo, sanzionato anche penalmente dagli articoli 325 e 623 del codice penale, di non divulgare ed utilizzare le informazioni acquisite. E' necessario che le persone che prendono visione di questa tesi vengano annotate nell'ultima pagina di questo documento.*

## INDICE

### INTRODUZIONE

<b>1. Evoluzione e vantaggi dei sistemi transdermici</b> .....	1
<b>2. Struttura della cute</b> .....	4
2.1. Epidermide .....	5
2.2. Derma.....	8
2.3. Ipoderma.....	8
2.4. Gli annessi cutanei .....	9
<b>3. Permeazione cutanea</b> .....	11
3.1. Vie di penetrazione attraverso la cute.....	11
3.2. Meccanismo di passaggio di un farmaco attraverso la barriera cutanea .....	12
3.3. Fattori che influenzano l'assorbimento cutaneo .....	15
3.3.1. Caratteristiche chimico-fisiche del farmaco.....	15
3.3.2. Formulazione del veicolo.....	16
3.3.3. Condizioni dello strato corneo .....	17
<b>4. Metodi per aumentare l'assorbimento cutaneo dei farmaci</b> .....	20
4.1. Metodi chimici.....	20
4.2. Metodi fisici .....	21
<b>5. Caratteristiche strutturali dei microaghi e possibili applicazioni in campo terapeutico</b> .....	24
<b>6. Metodi per valutare la penetrazione e la permeazione cutanea in vivo e in vitro</b> ..	28
6.1. Studi <i>in vivo</i> .....	28
6.2. Studi <i>in vitro</i> .....	29
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	31

# ***Introduzione***

# ***1. Evoluzione e vantaggi dei sistemi transdermici***

I farmaci possono essere veicolati nell'organismo attraverso varie vie (Langer 1998).

La via orale è generalmente la più diffusa e meglio accettata dal paziente, contrariamente a quanto spesso accade per la via parenterale.

Tuttavia molti principi attivi vengono degradati nel tratto gastro-intestinale o per effetto del metabolismo di primo passaggio epatico o per uno scarso assorbimento a livello intestinale o per instabilità al pH gastro-intestinale, non permettendo di raggiungere l'efficacia terapeutica.

Un'alternativa valida potrebbe essere la somministrazione attraverso la cute facendo uso di aghi ipodermici per veicolare farmaci direttamente nei liquidi biologici, con vantaggi per le molecole di grosse dimensioni sottoposte a degradazione epatica. Tuttavia rimane l'inconveniente del dolore e dell'ago-fobia che molti pazienti avvertono.

La somministrazione transdermica permette di superare i limiti imposti dalla somministrazione orale, parenterale e ipodermica, consentendo un rilascio del farmaco indolore, controllato e prolungato nel tempo (Prausnitz et al. 2004); nonostante che le concentrazioni plasmatiche efficaci vengano raggiunte con un certo ritardo, la via transdermica appare adatta alla somministrazione di farmaci con breve emivita biologica o con indici terapeutici ristretti in condizioni di maggior sicurezza diminuendo rischi di sotto o sovra-dosaggio.

Tuttavia l'ostacolo rimane per quei farmaci scarsamente assorbiti o notevolmente metabolizzati nella cute; solo i principi attivi con appropriate caratteristiche chimico-fisiche, spiccata attività terapeutica a basse dosi e assenza di sensibilizzazione o irritazione cutanea sono i candidati ottimali.

Il problema maggiore è riuscire a superare le proprietà di barriera dello strato corneo, di spessore 10-20  $\mu\text{m}$ , strato più esterno dell'epidermide con cui la forma farmaceutica transdermica viene a contatto. Questa barriera fisica permette generalmente il trasporto di molecole lipofile (con un coefficiente di ripartizione compreso tra 1 e 3), con peso

inferiore a 800 Da, condizioni restrittive per poter costituire un' efficace via di somministrazione (Prausnitz et al. 2004).

Centinaia di formulazioni topiche sono state sviluppate con la finalità di raggiungere un trattamento mirato a livello locale, sfruttando sistemi vescicolari quali liposomi e niosomi, molecolari come le ciclodestrine e particellari come microcapsule e nanoparticelle (Imbert et.al. 1995, Nacht et al. 1995).

Il primo sistema transdermico per la somministrazione sistemica fu approvato negli USA nel 1979 e si trattava di un cerotto a base di scopolamina per il trattamento della cinetosi; si componeva di una riserva di farmaco e uno strato adesivo da porre sulla pelle in grado di rilasciare il principio attivo nel torrente circolatorio con un effetto prolungato nel tempo.

Attualmente sono disponibili dispositivi per la somministrazione transdermica a base di nitroglicerina, clonidina, estradiolo, fentanile, lidocaina, testosterone, propranololo, flurbiprofene e nicotina (Prausnitz et al. 2008); altri principi attivi sviluppati nel corso degli anni o ancora in fase di sperimentazione clinica comprendono fisostigmina (Moller et al. 1999), selegilina (Lee et al. 2007), insulina (Wong TW 2009), 5-fluorouracile (Chandrashekar et al. 2007, Chandrashekar et al. 2008) e rotigotina (Muller et al. 2008). Particolare interesse riveste la somministrazione di peptidi, trattamenti genetici a base di DNA e RNA e vaccini (Foldvari et al. 2006, Glenn et al. 2006).

Dal 2003 al 2007 la velocità di immissione sul mercato di cerotti transdermici è triplicata rispetto agli anni precedenti, con buone prospettive per ulteriori sviluppi futuri e l'opportunità di modificare la permeabilità ai fini di incrementare l'assorbimento attraverso la cute è un argomento di forte interesse per migliorare l'efficacia terapeutica sia di formulazioni dermatologiche che sistemiche.

La ricerca è impegnata nel trovare il giusto equilibrio tra aumento della permeazione transdermica e sicurezza, compliance e basso costo per il paziente.

Per aumentare la diffusione percutanea sono disponibili sistemi in grado di ridurre reversibilmente l'effetto barriera dello strato corneo modificando la sua struttura e favorendo la formazione di vie addizionali per il passaggio di molecole esogene; a tale scopo sono usati metodi chimici che prevedono l'utilizzo di promotori di permeazione (enhancer) ( Williams et al. 2004) o metodi fisici (Prausnitz et al.2001). Attualmente esiste un numero considerevole di molecole con proprietà di enhancer efficaci nel promuovere la permeazione di molecole di modeste dimensioni. I metodi fisici

comprendono ionoforesi (Kalia et al.2004), elettroporazione (Denet et al. 2004), uso di ultrasuoni (Paliwal et al. 2006), uso di calore (Bramson et al. 2003), micro dermoabrasioni (Herndon et al. 2004) e uso di microaghi (Prausnitz et al. 2004); la creazione di canali attraverso lo strato corneo porta a sfruttare queste tecniche nel promuovere la permeazione di macromolecole. Il successo dell'utilizzo dei microaghi ha prodotto negli ultimi anni un forte interesse scientifico nell'ambito della ricerca in quanto rappresenta il compromesso ideale tra efficacia, sicurezza e compliance del paziente, con facilità di applicazione e basso costo.

Nell'ambito di queste ricerche si inserisce la presente tesi che ha avuto l'obiettivo di indagare da una parte le proprietà enhancer di un nuovo gruppo di composti chimici di sintesi, scelti per l'analogia strutturale con l'Azona (Jampilek et al.2010), promotore chimico ormai assodato; dall'altra la capacità di una particolare categoria di microaghi di promuovere la permeazione transdermica di molecole idrofile poco affini allo strato corneo.

## *2. Struttura della cute*

La cute è l'organo più esteso del nostro corpo, costituisce circa il 16% del suo peso e ricopre un'area di 1,8 m<sup>2</sup>. Ha uno spessore che varia tra 0,5 e 2 mm a seconda dell'individuo e della regione anatomica: è massimo sul palmo delle mani e la pianta dei piedi e minimo sulle palpebre e nella regione auricolare posteriore; la pelle maschile è tipicamente più spessa di quella femminile. Essa svolge molte funzioni:

- Protettiva dalle aggressioni di microrganismi esterni, dai raggi ultravioletti, da agenti tossici e insulti meccanici
- Di controllo nella perdita di acqua, elettroliti e sostanze varie
- Sensoriale
- Di termoregolazione

La cute nello strato più interno contiene fino al 70% di acqua con pH analogo a quello fisiologico, mentre salendo in superficie il contenuto di acqua scende intorno al 10-25 % e il pH risulta compreso tra 4.2 e 5.6.

La cute è un organo dinamico che subisce continui cambiamenti nel corso della vita.

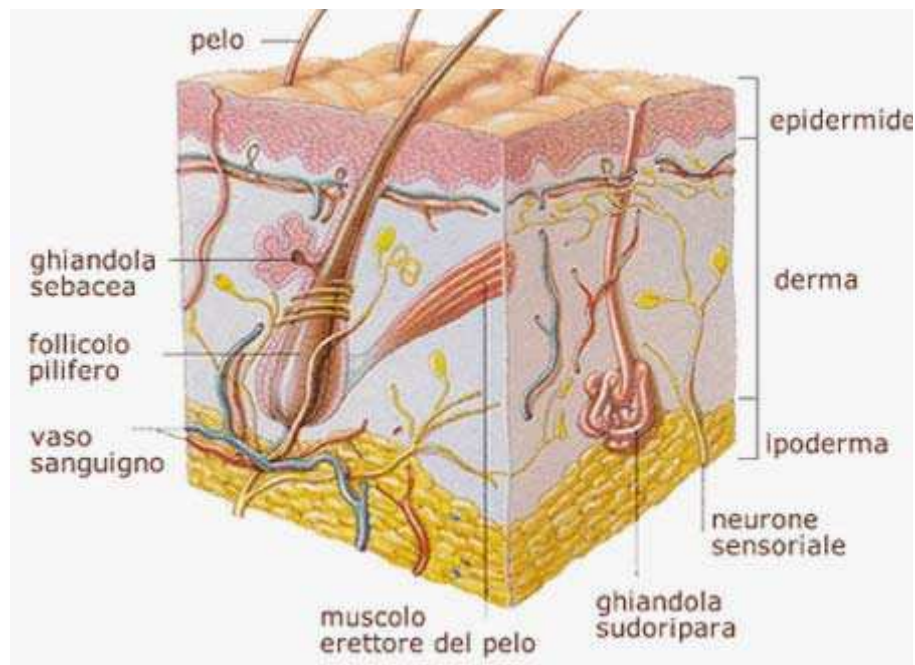
Nella cute si possono distinguere 3 strati funzionali (fig. 1) :

- Epidermide, che è lo strato più esterno, con funzione di barriera
- Derma, lo strato intermedio, con funzione di supporto
- Ipoderma, che è il tessuto sottocutaneo e agisce come ammortizzatore meccanico, isolante termico e riserva calorica.

Distribuiti in questa struttura si trovano gli annessi cutanei che, impiantati nel tessuto adiposo sottocutaneo, si estendono sino alla superficie della cute e sono:

- follicoli piliferi con annesse ghiandole sebacee
- ghiandole sudoripare eccrine
- ghiandole sudoripare apocrine

**Fig.1.** Organizzazione strutturale della cute



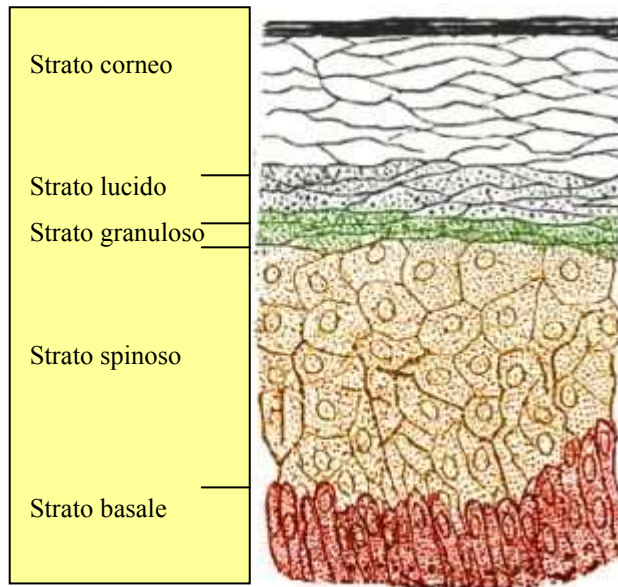
## 2.1. Epidermide

E' un derivato principalmente dell'ectoderma, colonizzato successivamente da pigmenti contenenti melanociti originati dalla cresta neurale, cellule di Langerhans originate dal midollo osseo e cellule sensitive di Merkel sempre originate dalla cresta neurale. Ha uno spessore di circa 0.2 mm, è priva di vasi ed è nutrita per diffusione di sostanze nutritive dal letto dei capillari del derma. Muovendo dalla profondità alla superficie si distinguono 4 diversi strati (fig. 2):

- basale o germinativo
- spinoso
- granuloso
- lucido
- corneo



**Fig.2.** Organizzazione strutturale dell'epidermide



### **Strato basale:**

separa l'epidermide dal derma .E' costituito da cellule basse, cubiche, disposte a palizzata e mitoticamente attive. Ha un andamento ondulato lungo le protuberanze papillari del derma e aderisce alla membrana basale attraverso emidesmosomi. I cheratinociti nuovi e differenziati muovono verso la superficie a rimpiazzare quelli persi per esfoliazione. Una piccola porzione di questo strato è occupata da melanina contenuta nei melanosomi e trasferita nei cheratinociti adiacenti ove viene immagazzinata in granuli.

### **Strato spinoso:**

costituito da vari strati di cellule poliedriche dal contorno irregolare, provviste di prolungamenti grazie ai quali entrano in contatto tra loro. Numerose sono le cellule di Langerhans, con la loro caratteristica struttura dendritica, che ricoprono un ruolo significativo nella risposta immunologica della pelle .

### **Strato granuloso:**

le cellule sono ulteriormente appiattite ma contengono ancora il nucleo e gli organuli citoplasmatici. Sono intensamente basofile per la presenza di granuli di cheratoialina

che è un precursore delle filaggrine, aggreganti dei filamenti di cheratina. Questi granuli potrebbero contenere anche loricrina che assieme alla precedente contribuisce a formare l'involucro interno cornificato.

### **Strato lucido:**

strato di transizione, costituito da 3-5 strati cellule acidofile appiattite, ancora vitali ma prive di nucleo. Sono cellule ricche di eleidina, sostanza proteica derivata dal catabolismo dei granuli di cheratoialina, e tonofilamenti. Questo strato non è sempre evidenziabile, ed è più facilmente riscontrabile nell'epidermide del palmo delle mani e della pianta dei piedi, essendo troppo sottile per essere visualizzato al microscopio ottico in altre sedi.

### **Strato corneo:**

strato più superficiale dell'epidermide, che costituisce il prodotto finale della cheratinizzazione: è costituito da 8-16 strati di cellule morte, appiattite, corneificate, anucleate, immerse in una matrice di doppi strati lipidici, con struttura molto regolare, in forma lamellare, contenente ceramidi, colesterolo e acidi grassi a lunga catena, in definito rapporto molare di 1:1:1, funzionale all'integrità della barriera. Le cellule prendono il nome di cheratinociti, costituite essenzialmente da proteine fibrose, e vengono rinnovate continuamente per esfoliazione, sostituite da nuove unità provenienti dallo strato germinativo tramite un processo che dura in media 2 settimane.

Considerando la composizione lipidica epidermica si può osservare un'evoluzione che procede parallelamente alla differenziazione cellulare: negli strati basale e spinoso si trovano steroli liberi e fosfolipidi, mentre nel granuloso questi ultimi si riducono ed aumentano invece glicosfingolipidi ed esteri del colesterolo. A livello dello strato corneo si trovano ceramidi, colesterolo ed acidi grassi a lunga catena (l'idrolisi dopo estrusione spiega le modificazioni di contenuto). La perdita di fosfolipidi e glicolipidi nello strato corneo lo rende più resistente all'acqua e l'assenza di zuccheri e fosforo aumenta la resistenza ai batteri e fa sì che il film lipidico sia in fase di gel a temperatura corporea. Oltre ai lipidi intercellulari anche la membrana di rivestimento dei corneociti è importante per la funzione di barriera e controllo dell'omeostasi cutanea: la sua fluidità e il passaggio attraverso essa saranno facilitati dalla prevalenza di acidi grassi insaturi che la rendono più elastica, mentre la prevalenza di acidi grassi saturi e

colesterolo diminuiscono la permeabilità e aumentano la rigidità, motivo per cui si trovano in abbondanza nello strato granuloso e corneo.

I cheratinociti sono fortemente sovrapposti e sono composti per il 70% da proteine fibrose,  $\alpha$ -cheratina (50%) e  $\beta$ -cheratina (20%), immerse in una matrice di lipidi (20%) e proteine non fibrose.

## **2.2. Derma**

Deriva principalmente dal mesoderma e ha come funzione primaria sostenere e supportare l'epidermide, con la quale entra direttamente a contatto attraverso la membrana basale. Il suo spessore può variare in un range da 0.6 mm sulle palpebre a 3 mm sul dorso, sul palmo delle mani e sulla pianta dei piedi. Contiene collagene che costituisce il 70% del derma, fibre elastiche, vasi sanguigni, strutture sensoriali e fibroblasti, le cellule più abbondanti a questo livello. I fibroblasti producono e secernono il procollagene, che viene idrolizzato da enzimi proteolitici in collagene, il quale si aggrega e assume una struttura reticolare in grado di conferire grande resistenza meccanica. Producono anche elastina e proteoglicani strutturali: infatti le fibre (collagene ed elastina) sono disperse in un gel acquoso costituito da glicosamminoglicani (principalmente acido ialuronico e dermatansolfato) e proteoglicani, che provvedono a garantire caratteristiche di appropriata viscosità e idratazione alla pelle. Il derma è suddiviso in 2 parti:

- superficiale o papillare
- profondo o reticolare

Lo strato papillare è costituito da tessuto connettivo lasso contenente capillari, fibre elastiche, reticolari e collagene.

Lo strato reticolare è costituito da tessuto connettivo denso contenente vasi sanguigni, mastociti, terminazioni nervose, vasi linfatici; a questo livello le fibre di collagene formano fasci robusti intrecciati con disposizione parallela alla superficie della cute. Tra i fasci si intersecano reti di fibre elastiche che conferiranno alla cute maggiore o minore caratteristiche di estensibilità. Le fibre elastiche sono particolarmente numerose attorno ai follicoli piliferi e agli adenomeri delle ghiandole.

## **2.3. Ipoderma**

Rappresenta lo strato più profondo della cute; esso mette in comunicazione il derma con le fasce muscolari e con il periostio, la membrana di tessuto connettivo che riveste

totalmente le ossa ad eccezione delle zone ove esse sono legate a legamenti, tendini o cartilagini. L'ipoderma è diversamente distribuito in rapporto all'età, alla razza, al sesso e alla regione corporea; il suo spessore oscilla in media tra 0,5 e 2 cm. In alcune sedi (naso, palpebra, padiglione dell'orecchio) l'ipoderma è assente, mentre in altre (regioni glutee, palmo della mano, pianta del piede) il suo sviluppo è massimo.

L'ipoderma è fortemente innervato e vascolarizzato e formato da connettivo lasso ricco di fibre elastiche, che permette il reciproco scorrimento del derma e degli strati connettivali profondi.

L'ipoderma è anche la sede del deposito di adipe che costituisce il *pannicolo adiposo sottocutaneo* quindi, in aggiunta alle sue capacità meccaniche di ammortizzazione, di sostegno e di isolante termico, rappresenta una riserva energetica nei periodi di digiuno (l'adipe di deposito, in un uomo di 70 Kg, equivale a 45-90.000 calorie).

Al suo interno sono localizzati la base dei follicoli piliferi, i nervi cutanei, la porzione secretrice delle ghiandole sudoripare. Da qui prendono origine i plessi cutanei che interesseranno il tessuto adiposo, connettivo e la parte superiore del derma, i plessi capillari che raggiungono la parte superiore del derma e la rete capillare intorno agli annessi cutanei.

## **2.4. Gli annessi cutanei**

1)Peli: si distribuiscono sull'intera superficie cutanea con maggiore o minore densità ad eccezione del palmo delle mani e della pianta dei piedi. Sono numerosi sul volto e sul cuoio capelluto. Il bulbo pilifero è accolto in una invaginazione tra epidermide e derma che prende il nome di follicolo pilifero. Il fusto del pelo consiste in una cuticola esterna che riveste una corteccia di cheratinociti e un midollo interno di cellule vitali. Ogni follicolo pilifero è fiancheggiato da una cellula germinativa e da melanociti, mentre lungo il fusto corre il muscolo erettore del pelo.

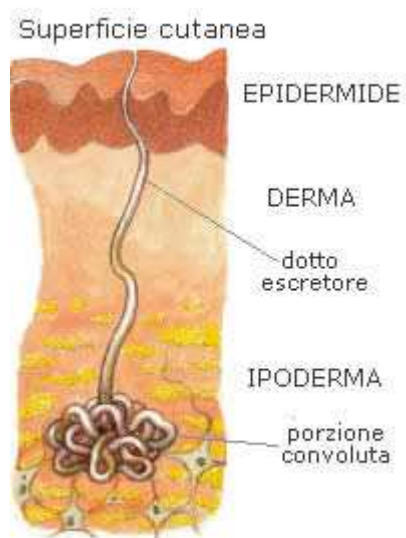
2)Ghiandole sebacee: derivano dalle cellule epidermiche e sono associate ai follicoli piliferi soprattutto del cuoio capelluto, del volto, del torace e della schiena. Dal punto di vista istologico si tratta di ghiandole alveolari composte, sono costituite da un dotto escretore unico e secernono sebo all'interno del follicolo pilifero; mentre la secrezione sudoripara ed apocrina è intermittente, quella sebacea è continua. Il meccanismo secretivo prevede un progressivo accumulo di sebo all'interno delle cellule secernenti,

che aumentano sempre più di dimensioni, fino a scoppiare. Per questo motivo all'interno del follicolo pilifero viene riversato non solo il sebo, ma anche il residuo delle cellule che l'hanno prodotto. Questa necrosi è compensata dalla continua produzione di nuove popolazioni cellulari. Le ghiandole sebacee:

- Influenzano le caratteristiche di permeabilità dell'epidermide
- Costituiscono un segnale ormonale
- Trasportano antiossidanti sulla superficie cutanea
- Proteggono contro i raggi UV

3) Ghiandole sudoripare: si dividono in eccrine e apocrine.

Le ghiandole sudoripare eccrine sono così definite in quanto ghiandole esocrine. Sono implicate essenzialmente nella funzione termoregolatrice, anche se contribuiscono alla regolazione dell'equilibrio idrico fisiologico e del film idrolipidico cutaneo. Affondano



fino all'ipoderma e comprendono una parte convoluta, che rappresenta l'unità secernente, ed un dotto escretore che si apre sulla superficie corporea. Ogni ghiandola sudoripara è riccamente vascolarizzata e circondata da una fitta rete di terminazioni prevalentemente adrenergiche; la secrezione è discontinua.

Le ghiandole sudoripare apocrine si aprono nel follicolo pilifero. Sono localizzate in particolari regioni anatomiche, soprattutto nel cavo ascellare, intorno alle areole mammarie, nella regione pubica e a livello del perineo. Sono formate da una porzione secernente raggomitolata e da una porzione tubulare semplice.

La secrezione di queste ghiandole è continua e avviene mediante parziale perdita dell'apice cellulare; il secreto accumulatosi nel lume, viene eliminato per contrazione delle cellule mioepiteliali innervate da fibre adrenergiche. Mentre il secreto delle ghiandole sudoripare eccrine è particolarmente fluido e trasparente, quello delle ghiandole apocrine è viscoso e opaco e la presenza di acidi grassi esterificati può far variare il suo colore da latteo a giallastro, come accade per il cerume.

Il pH del sudore è leggermente acido, di norma compreso tra 4 e 6,5. È una soluzione acquosa diluita contenente l'1% di soluti; di questi,  $\frac{3}{4}$  sono dati da sostanze inorganiche

(prevalentemente NaCl) e  $\frac{1}{4}$  da sostanze organiche (urea, acido urico, creatinina, acido lattico).

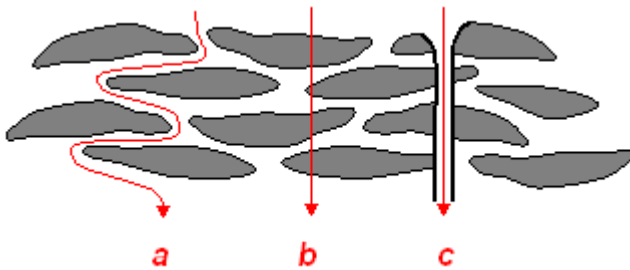
### 3. *Permeazione cutanea*

#### 3.1. Vie di penetrazione attraverso la cute

La permeazione cutanea di un farmaco è fortemente limitata dallo strato corneo a causa della bassa permeabilità dei suoi elementi cellulari alla maggior parte dei soluti; essa può avvenire attraverso 3 modalità (fig.3):

- penetrazione tra le cellule dello strato corneo: via intercellulare o via lipofila.
- penetrazione attraverso le cellule dello strato corneo: via transcellulare o via idrofila.
- penetrazione attraverso i follicoli piliferi, le ghiandole sudoripare o sebacee: via pilosebacea.

**Fig.3.** vie di penetrazione cutanea



Il contributo della via pilosebacea è irrilevante in quanto solo lo 0,1-0,5% della superficie corporea è occupata da questa struttura (Diembeck et al. 2005) quindi la via prescelta rimane quella attraverso lo strato corneo e la modalità dipenderà soprattutto dal coefficiente di ripartizione della molecola.

Le sostanze lipofile utilizzano la via intercellulare, con un percorso particolarmente tortuoso, mentre i composti idrofili o polari possono permeare in modo più veloce attraverso la via transcellulare, sfruttando la frazione proteica dei cheratinociti. E'

importante notare che la maggior parte dei diffondenti permea lo strato corneo attraverso entrambe le vie.

Nonostante la tortuosa via intercellulare costituisca la barriera più grande per la maggior parte dei farmaci (Elias et al.1977; Elias, 1981; Elias 1983; Potts,1989; Scheuplein e Blank, 1971; Sweeney e Downing, 1970; Stoughton, 1989), anche la natura essenzialmente acquosa dell'epidermide vitale e del derma può rappresentare una barriera significativa per la permeazione di molecole altamente lipofile (Higuchi, 1978; Flynn, 1985). I processi farmacodinamici di penetrazione, permeazione e assorbimento sono pertanto influenzati dalla struttura cutanea, dalla struttura chimico-fisica della formulazione usata come veicolo e dalla natura del principio attivo, oltre che dalla dose applicata. Nel grafico sotto (fig. 4), che descrive la velocità di assorbimento cutaneo, si vede che la diffusione attraverso le unità pilo sebacee, se sfruttabile in base alle caratteristiche chimico-fisiche del permeante, seppure di piccola entità è estremamente rapida e quindi risulta importante all'inizio dell'assorbimento prima di raggiungere l'equilibrio allo stato stazionario. Superata questa fase la via transepidermica diventa dominante e la velocità di assorbimento diventa costante.

**Fig.4.** velocità di assorbimento cutaneo



### **3.2. Meccanismo di passaggio di un farmaco attraverso la barriera cutanea**

I farmaci permeano attraverso la cute principalmente per diffusione quindi il loro trasferimento di massa può essere descritto attraverso la legge di Fick: secondo questa equazione il flusso di una molecola attraverso la membrana è proporzionale alla differenza di concentrazione ai 2 lati di essa, quindi segue una cinetica di primo

ordine. Se inoltre assumiamo che il gradiente di concentrazione sia localizzato esclusivamente a livello dello strato corneo, rappresentante la membrana, e che siano presenti condizioni di sink, la quantità di farmaco permeato nel tempo per unità di superficie è data da :

$$\frac{dq}{dt} = \frac{R \cdot D_s \cdot A \cdot C_v}{h}$$

Dove :

$dq/dt$  = velocità di permeazione cutanea del farmaco

$R$  = coefficiente di ripartizione tra strato corneo e veicolo

$C_v$  = concentrazione di farmaco disciolto nel veicolo

$D_s$  = coefficiente di diffusione del farmaco attraverso lo strato corneo

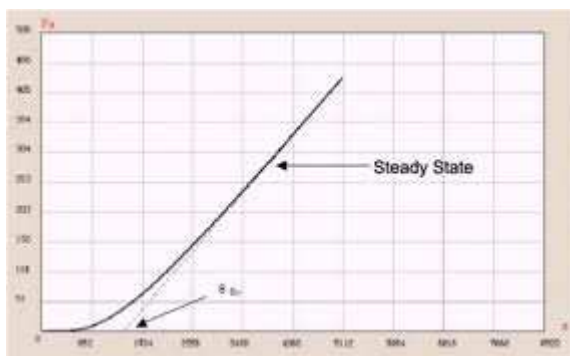
$A$  = superficie interessata dall'assorbimento

$h$  = spessore dello strato corneo

Da questa legge si evince che il trasporto attraverso lo strato corneo è direttamente proporzionale alla solubilità ed alla diffusibilità della sostanza applicata. La solubilità di una sostanza è espressa dal suo coefficiente di ripartizione  $R$ , derivante dal rapporto tra la solubilità della sostanza all'equilibrio nello strato corneo e la solubilità della sostanza all'equilibrio nel veicolo, per cui  $R$  indica l'affinità del principio attivo per lo strato corneo (Rougier et al. 1990).

Un profilo tipico della concentrazione di farmaco che diffonde attraverso l'epidermide nel tempo è riportato in figura 5:

**Fig.5.** profilo della concentrazione di farmaco che diffonde attraverso l'epidermide



Nella parte iniziale non è ancora stato raggiunto lo stato stazionario: tale periodo, denominato lag time, dà una misura del tempo necessario al farmaco per saturare la



barriera cutanea ed è influenzato notevolmente dallo spessore della membrana e dal coefficiente di diffusione del farmaco; questa fase è seguita da un flusso costante.

### **3.3. Fattori che influenzano l'assorbimento cutaneo**

Tra i vari fattori che possono influenzare l'assorbimento transepidermico i più importanti sono le caratteristiche chimico-fisiche del farmaco, la formulazione del veicolo e le condizioni dello strato corneo.

#### **3.3.1. Caratteristiche chimico-fisiche del farmaco**

Proprietà, quali la solubilità in acqua, il pH, le dimensioni molecolari, la concentrazione, la stabilità del farmaco, possono influenzare la permeazione cutanea (Michael et al. 1975).

##### Solubilità :

la solubilità in acqua di un farmaco può dare problemi nella progettazione di un sistema terapeutico transdermico poiché il controllo della velocità di rilascio, e quindi l'assorbimento, possono essere ostacolati dalla velocità di dissoluzione. Le molecole che hanno una bassa solubilità in acqua possono dare origine ad un depot e sono sorgenti costanti di farmaco, anche se la quantità disponibile per l'assorbimento può risultare insufficiente.

##### pH :

un farmaco nella forma non ionizzata attraversa lo strato corneo più facilmente della forma ionizzata perché è più liposolubile quindi le condizioni di pH, influenzando il grado di dissociazione del farmaco, possono modificare la permeazione transdermica.

##### Dimensioni molecolari:

la dimensione molecolare regola la diffusione delle molecole di farmaco attraverso le membrane biologiche e può diventare un ostacolo alla permeazione. Un peso molecolare intorno a 800 Da è il limite massimo per poter diffondere liberamente attraverso lo strato corneo.

##### Concentrazione:

determina l'attività termodinamica e influenza la diffusione del farmaco dentro e fuori il veicolo; per una diffusione ottimale la concentrazione dovrebbe essere mantenuta alla saturazione.

##### Stabilità del farmaco:

è una condizione essenziale per l'applicazione del prodotto sulla cute; può essere significativamente influenzata da enzimi metabolici cutanei implicati prevalentemente in processi ossido riduttivi in grado di modificare chimicamente le sostanze applicate con possibile perdita di biodisponibilità

### **3.3.2. Formulazione del veicolo**

Il veicolo è definito dalla tipologia di formulazione e dagli eccipienti. Il veicolo e gli eccipienti possono influenzare la velocità e l'intensità dell'assorbimento e conseguentemente la biodisponibilità e l'efficacia; sono infatti in grado di influire su caratteristiche dello strato corneo quali la sua idratazione, e sul coefficiente di ripartizione/diffusione del principio attivo (Scarpignato 2001). Per idratare la cute si possono usare, per esempio, veicoli con caratteristiche occlusive tali che la loro applicazione formi una pellicola in grado di impedire l'evaporazione dell'acqua. In questo modo l'acqua che è presente negli strati più profondi della pelle raggiunge gli strati superficiali aumentandone l'idratazione che passa dal normale 10% a circa 50%; in queste condizioni la penetrazione di corticosteroidi attraverso la cute può aumentare di circa 100 volte (Clementi e Fumagalli, UTE). Viceversa, la cessione di principi attivi lipofili può risultare molto ridotta a causa dell'elevata affinità per il mezzo disperdente; i glicoli, sotto forma liquida come il glicol propilenico o semisolidi come il glicol polietilenico, influenzano la ripartizione tra veicolo e strato corneo aumentando la solubilità dei farmaci lipofili all'interno di esso. Infatti assorbono acqua endogena dall'epidermide e diminuiscono l'idratazione dello strato corneo.

Al contrario i solventi aprotici come il dimetilsolfossido, DMSO, aumentano significativamente la velocità di penetrazione dei farmaci idrofili attraverso la cute, in quanto il loro carattere di igroscopicità provoca una forte idratazione dello strato corneo; sono però dotati di una certa tossicità ed il loro uso è limitato.

Facendo considerazioni sul pH, ad esempio l'assorbimento di principi attivi con caratteristiche acide potrà essere aumentato usando un veicolo acido in quanto quest'ultimo favorirà la forma indissociata, priva di carica.

Gli emulsionanti e tutte le sostanze tensioattive in genere offrono la possibilità di accelerare la penetrazione di un farmaco svolgendo un'azione complementare al veicolo.

Tra le diverse forme farmaceutiche gli idrogeli, le sospensioni acquose e le emulsioni O/A si comportano sulla pelle come mezzi acquosi, mentre gli unguenti, le paste anidre e le emulsioni A/O funzionano come sistemi lipidici.

### **3.3.3. Condizioni dello strato corneo**

Nello SC il contenuto di acqua è del 10-15% ed è prevalentemente associato alla cheratina intracellulare. La presenza di sostanze igroscopiche permette di trattenere acqua sufficiente a conferire alla cute elasticità e morbidezza, mentre il film idrolipidico che avvolge lo SC evita la perdita delle sostanze igroscopiche solubili in acqua (Rawlings et al. 2004) . Il grado di idratazione dello strato corneo dipende dalla quantità di acqua assorbita dagli strati sottostanti, dalla quantità di acqua persa per evaporazione, determinata da fattori ambientali quali temperatura, umidità e ventilazione e dalla capacità di questo strato di trattenere l'acqua (Middleton 1986). La regolazione dell'idratazione della cute è dovuta al NMF (fattore di idratazione naturale), un insieme di sostanze solubili in acqua presenti nello strato più esterno della cute. Queste sostanze, in parte provengono dalla secrezione delle ghiandole sudoripare e sebacee e in parte dalla degradazione della cheratina e dei lipidi.

La composizione del NMF è data da: aminoacidi 40% , acido piroglutamico 12% , lattato di sodio 12% , urea 7% , glucidi 4% , sali 25% (Marty, 2002). Queste sostanze, oltre all'idratazione, regolano anche il pH cutaneo in un range tra 5,5-6,5 (funzione tampone). Mantenere l'idratazione cutanea a livelli opportuni è fondamentale per facilitare il passaggio delle sostanze polari: la porzione proteica si rigonfia per assorbimento di acqua, aumentando la grandezza dei pori.(Marriot et al., 1992). Nello spazio intercellulare il basso contenuto di acqua legata ai gruppi polari non altera l'organizzazione dei lipidi e non ne riduce la permeabilità. Tuttavia sembra esistere un meccanismo omeostatico che previene l'iperidratazione della cute; l'occlusione può aumentare notevolmente l'assorbimento di sostanze idrofile, ma in molti casi si tratta di un effetto riserva.

Un altro fattore importante è la temperatura: aumentando la temperatura si ha una diminuzione di viscosità del veicolo con conseguente aumento della diffusione attraverso di esso.

Alterazioni dell'umidità esterna possono influire sulla proteolisi della filaggrina, sulla sintesi di lipidi, DNA e proteine all'interno dei cheratinociti.

Inoltre l'assorbimento è molto influenzato dalle caratteristiche anatomiche della cute al sito di assorbimento: decresce progressivamente dalle palpebre alla pianta del piede perché la permeabilità è inversamente proporzionale allo spessore. Subentrano poi altri fattori che determinano il grado di penetrazione come la densità degli annessi cutanei, l'area superficiale dei corneociti, il contenuto di lipidi intercellulari. Alterazioni della barriera cutanea sia attraverso metodi chimici che fisici, possono produrre un'alterazione del TEWL (transepidermal water loss) in seguito a variazioni di tipo strutturale, con variazioni nel processo di assorbimento transdermico.

Altri aspetti connessi con le condizioni dello strato corneo, che possono alterarne la permeabilità sono:

Integrità dello strato corneo:

eventuali lesioni dovute ad insulti meccanici o termici possono far variare l'assorbimento.

Presenza di patologie cutanee:

i processi patologici possono compromettere la barriera in più modi: influenzando direttamente la composizione di proteine e lipidi (per esempio: ittiosi, dermatite atopica e dermatite da contatto) (Williams, 1992), oppure causando una modificazione dello strato corneo per alterazione del processo di proliferazione dei corneociti (per esempio psoriasi) (Christophers, 1993). Anche l'esposizione ai raggi ultravioletti provoca una modificazione dello SC che, se cronica, comporta un incremento della barriera per aumento del contenuto lipidico della cute, se acuta, comporta una riduzione della funzione barriera associata ad intensa desquamazione (Parrish, 1983).

Età:

La cute del neonato ha uno strato corneo incompleto, molto più sottile e idratato rispetto all'adulto il che conduce a una aumentata capacità di assorbimento. Nell'anziano il turnover cutaneo è ridotto, come pure lo spessore epidermico, mentre lo strato corneo risulta ispessito e meno permeabile; questo provoca un rallentamento sia dell'assorbimento cutaneo che della capacità di ripristino della barriera in seguito a danneggiamento.

Razza:

lo strato corneo di individui di razza nera presenta una maggiore stratificazione ed è generalmente meno permeabile rispetto a quello di individui di razza bianca, sebbene lo spessore sia analogo.

Variabilità individuale:

a parità di età, sesso e sito di applicazione, l'assorbimento cutaneo può variare per cause costituzionali ed endocrine.

L'assorbimento cutaneo di sostanze attive da formulazioni topiche costituisce circa l'1-5 % della dose applicata quindi, visto il successo dei sistemi transdermici, diventa fondamentale l'utilizzo di sistemi per aumentare la permeazione cutanea.

## ***4. Metodi per aumentare l'assorbimento cutaneo dei farmaci***

Per aumentare la diffusione cutanea possono essere utilizzati metodi chimici o metodi fisici.

### **4.1. Metodi chimici**

Prevedono l'uso di promotori di permeazione, sostanze chimiche in grado di alterare le proprietà di barriera della cute. I promotori possono essere suddivisi in numerose categorie in base alla struttura, al meccanismo d'azione e al tipo di farmaco sul quale esplicano la loro attività; Karande et al. ne hanno proposto una classificazione dettagliata in cui si distinguono (i) tensioattivi anionici (es. sodio lauryl solfato), (ii) tensioattivi cationici (es. alchil-ammonio bromuro), (iii) tensioattivi zwitterionici (es. dodecil betaina), (iv) tensioattivi non-ionici (es. polisorbate, polossameri), (v) acidi grassi (es. acido oleico e acido palmitico), (vi) Sali sodici di acidi grassi (es. sodium octil sulfate e sodium N-lauroilsarcosine), (vii) esteri grassi (es. glyceryl monoleate, stearyl methacrylate e isopropyl myristate), (viii) ammine grasse (es. alchilammine a catena lunga), (ix) composti azone-like (es. azone e derivati e pirrolidoni) e (x) altro (terpeni, urea e ciclodestrine). Il loro impiego prevede di aggiungere alla formulazione convenzionale un eccipiente chimico in grado di ridurre reversibilmente le proprietà di barriera dello strato corneo andando o ad inserire molecole amfifile all'interno del doppio strato lipidico e disorganizzando la struttura fortemente ordinata, o estraendo lipidi e creando quindi regioni libere dell'ordine del nanometro come accade per solventi e tensioattivi o modificando i corneociti attraverso denaturazione della cheratina (Menon 1998). A livello molecolare la regione polare del promotore è in grado di rompere i legami a idrogeno che tengono unite le ceramidi e sostituirsi come accettore di un nuovo legame a idrogeno; questa abilità è fortemente correlata al numero di eteroatomi presenti nel dominio polare del promotore ( Moser et al. 2001, Ongpipattanakul et al. 1991) . L'aumento di fluidità contribuisce invece a favorire la diffusione di sostanze idrofile. In condizioni drastiche, specialmente con solventi polari e tensioattivi, i soluti possono raggiungere il citoplasma con distruzione della cheratina e vacuolizzazione. Alcuni tipi di enhancer possono inoltre agire da cosolventi

aumentando sia l'attività termodinamica del farmaco sia il suo coefficiente di ripartizione, favorendone il rilascio dal veicolo. Il promotore ideale dovrebbe rispondere ad una serie di requisiti quali (i) assenza di tossicità, irritabilità e reazioni allergiche, (ii) avere effetto reversibile che scompare dopo rimozione dell'applicazione, (iii) essere farmacologicamente e chimicamente inerte, (iv) avere azione ripetibile e prevedibile, (v) essere fisicamente e chimicamente compatibile con il principio attivo ed altri eccipienti della formulazione, (vi) avere buone proprietà organolettiche, (vii) bassi costi di sintesi e, come imposto recentemente, (viii) essere biocompatibile (Finnin et al. 1999). E' tuttavia impossibile trovare un composto che soddisfi tutte le caratteristiche, e, proprio a causa di questo, talvolta sopraggiungono problemi di tossicità o irritabilità nei tessuti vitali dell'epidermide. Karande et al. hanno formulato delle linee guida per ottenere il promotore che aumenti la permeabilità cutanea senza causare irritazione: attraverso la tecnica FTIR (Fourier transform infrared) questo dovrebbe alterare lo stretching simmetrico dei gruppi CH<sub>2</sub> dei lipidi dello strato corneo ( che correla con l'aumento di permeabilità cutanea) ed evitare cambiamenti nella banda di assorbimento relativa al gruppo amidico presente nelle proteine dello strato corneo (che correla con l'irritazione cutanea). L'azone è stata la prima molecola sintetizzata e brevettata come promotore di permeazione transdermica nel 1976, usato sia per molecole idrofile che lipofile se disperso in un mezzo polare. Negli anni successivi fino ad oggi sono stati sintetizzati molti analoghi per migliorare le proprietà della molecola di cui, sebbene siano state avanzate più ipotesi, non si conosce ancora con precisione il meccanismo d'azione (Williams et al. 2004).

## 4.2. Metodi fisici

I principali metodi fisici in grado di promuovere un effetto sistemico del farmaco sono:

1. Ionoforesi: attraverso l'uso di corrente elettrica si genera una forza motrice proporzionale che promuove il passaggio attraverso lo strato corneo sia di molecole cariche, mosse per elettroforesi, sia di quelle debolmente o prive di carica, mosse dal flusso elettrosmotico di acqua generato dal movimento preferenziale di cationi mobili come Na<sup>+</sup> (Kalia et al. 2004). Quando il farmaco è carico positivamente, l'anodo (elettrodo positivo) è collocato in contatto con la soluzione contenente il principio attivo mentre il catodo in un'altra parte del corpo. Nel momento in cui viene applicata una differenza di potenziale, il farmaco è respinto



dall'anodo (elettrorepulsione), attraversa la pelle ed entra nel sistema circolatorio per effetto di attrazione da parte del catodo. I fluidi extracellulari e il sangue contengono elettroliti come sodio e cloro che partecipano attivamente al trasferimento di carica attraverso la pelle, contrariamente allo strato corneo che si comporta da barriera per il potere isolante dei lipidi. Una frazione di carica viene quindi trasportata da ioni diversi dal farmaco e questo si traduce in un abbassamento della quantità di farmaco per unità di superficie che viene trasportato mediante ionoforesi. Dato che la ionoforesi non cambia l'assetto dello strato corneo, è ben applicabile per piccole molecole cariche o macromolecole con peso molecolare non superiore a poche centinaia di Da.

2. Elettroporazione: attraverso l'applicazione di un breve (pochi millisecondi) ma intenso (300-400 mV) impulso elettrico, si ha un evidente riarrangiamento del doppio strato lipidico dello strato corneo con formazione di percorsi transitori all'interno della cute (pori idrofilici) che possono persistere per ore, incrementando in modo esponenziale il passaggio di piccole molecole, peptidi, vaccini e DNA (Denet et al. 2004). Dato che la resistenza elettrica dello strato corneo è molto maggiore di quella dei tessuti sottostanti, l'effetto sarà localizzato e mantenuto a quel livello attraverso l'uso di microelettrodi, impedendo il raggiungimento di terminazioni nervose e motoneuroni. L'aumento di permeabilità transdermica si ha grazie al sinergismo tra diffusione, elettroforesi ed elettrosmosi.

3. Sonoforesi: consiste nell'applicazione di ultrasuoni a basse frequenze che promuovono la formazione, oscillazione e talvolta collasso di bolle d'aria sotto l'effetto di un campo ultrasonico. Le cavità che si formano in seguito a questo processo provocano alterazioni strutturali dello strato corneo e impediscono la dispersione dell'energia degli ultrasuoni al di fuori di esso, rendendo possibile confinare l'effetto terapeutico nella regione in cui si localizzano (Ogura et al. 2008). La sonoforesi permeabilizza lo strato corneo a farmaci sia in forma ionica che non ionica anche se questa tecnica non è considerata particolarmente significativa per incrementare il trasporto di sostanze attraverso la cute.

4. Ablazione termica: consiste in un riscaldamento transitorio e selettivo della superficie cutanea per generare micro-perforazioni nello strato corneo; temperature pari a centinaia di gradi sono applicate per micro o millisecondi senza coinvolgere i tessuti sottostanti (Bramson et al. 2003, Levin et al. 2005 ). Questo

riscaldamento dovrebbe generare una rapida evaporazione dell'acqua dello strato corneo lasciando liberi canalicoli sulla superficie cutanea.

5. Microdermabrasioni: è una tecnica di rimozione dello strato corneo spesso usata a fini cosmetici, che ha portato buoni risultati anche in studi condotti su lidocaina, 5-fluorouracile (Herndon et al.2004) e vaccini.

6. Microaghi: aumentano selettivamente la permeabilità nello strato corneo creando dei microcanali attraverso il suo spessore che, riempiendosi dei liquidi interstiziali, costituiscono una via di passaggio per molecole idrofile (Prausnitz et al. 2008) . Essi sono in grado di legare il farmaco e promuoverne la penetrazione cutanea durante l'inserzione o, come accade per i microaghi cavi, creare un flusso convettivo attraverso la cute. Ai microaghi sono stati legate sia piccole molecole che proteine, DNA e particelle virali e negli ultimi 13 anni i progressi fatti nel campo della loro fabbricazione e applicazioni ne hanno promosso una posizione in prima linea nella ricerca sui sistemi transdermici.

## ***5. Caratteristiche strutturali dei microaghi e possibili applicazioni in campo terapeutico***

Il primo articolo presente in letteratura riguardo l'utilizzo dei microaghi risale al 1998 (Henry et al.), anche se fino a quel momento alcuni lavori erano già stati brevettati: si trattava di microaghi lunghi 150  $\mu\text{m}$ , in materiale siliconico, disposti in matrice. Il risultato fu un aumento nella permeazione di calceina di 4 ordini di grandezza e nel testo si erano già messi in evidenza i punti chiave attorno ai quali avrebbero ruotato poi tutte le successive sperimentazioni scientifiche:

- Metodo di fabbricazione
- Geometria e caratteristiche strutturali
- Dimensioni e densità
- Tecnica di applicazione
- Tempo di inserzione
- Forza di applicazione

Trovare il compromesso ideale tra tutti questi parametri garantisce di ottenere una promozione nella permeazione transdermica che si differenzia non solo per l'efficacia ma soprattutto per l'assoluta assenza di dolore e irritazione per il paziente; come dimostrato da studi in vivo, il rischio di contaminazione microbica risulta essere inferiore all'utilizzo di aghi ipodermici (Donnelly et al. 2009).

La fabbricazione dei microaghi si avvale della tecnologia MEMS (micro-electro-mechanical-systems), che ha unito i principi dell'elettronica al micromachining, ovvero quelle tecniche sfruttate per la realizzazione di microstrutture meccaniche; questo ha permesso di integrare su uno stesso substrato diverse funzioni: elettriche, meccaniche, ottiche. Questa tecnologia si avvale di procedure particolarmente complesse che variano a seconda del risultato che si vuole ottenere. Infatti si possono distinguere microaghi (1) ***in-plane*** e (2) ***out-of-plane*** in base all'orientamento del loro asse longitudinale, parallelo o perpendicolare al substrato. Altra classificazione consiste nel distinguere ***microaghi solidi*** e ***microcapillari***: i microaghi solidi sono quelli maggiormente impiegati nella somministrazione transdermica, mentre i microcapillari trovano più largo impiego per l'iniezione o il

prelievo soprattutto a livello cellulare. Attualmente sono disponibili matrici di microaghi in silicone, palladio, titanio, polimeri vari e carboidrati; in particolare l'uso di polimeri biocompatibili dà la possibilità di integrare nella matrice di microaghi solidi il farmaco da veicolare, consentendone poi il rilascio a livello cutaneo dopo biodegradazione o dissoluzione degli stessi nei fluidi interstiziali.

Park et al.(2005) hanno evidenziato l'efficienza di matrici di microaghi fatte in poli-L-acido lattico (PLA) , poliacido glicolico (PGA) o copolimeri di entrambi nell'aumentare l'assorbimento cutaneo di macromolecole come l'albumina di siero bovino. Recentemente Lee et al. (2008) hanno descritto la fabbricazione di una matrice di microaghi a partire da una miscela acquosa di carbossimetilcellulosa e amilopectina. Donnelly et al.(2010) hanno portato all'attenzione la resistenza di microaghi costruiti in Gantrez®, un co-polimero del metilvinil etero con anidride maleica e la loro efficacia per l'assorbimento cutaneo di teofillina. Li et al. (2009) hanno invece testato microaghi in maltosio per la somministrazione transdermica di immunoglobuline umane (IgG).

I microaghi sono essenzialmente sfruttati per veicolare macromolecole, quindi trovano impiego nella somministrazione di insulina (Martano et al.2004), DNA (Chabri et al.2004) e vaccini (Bal et al.2011).

L'uso dei microaghi aumenta di diversi ordini di grandezza la permeabilità cutanea di particelle con raggio superiore a 50 nm; questo viene osservato, ad esempio, per somministrazione intracellulare di calceina in cellule cancerose prostatiche nello studio di McAllister et al.(2003).

Le strategie più diffuse per l'applicazione di microaghi solidi comprendono:

- **dip and scrape**: dopo immersione in una soluzione contenente il farmaco, i microaghi vengono sfregati sulla pelle e, attraverso le microabrasioni così prodotte, si ha il rilascio del farmaco. In questo modo vengono somministrati plasmidi (Mikszta et al. 2002).
- **poke with patch**: i microaghi vengono impiegati per realizzare dei fori nello strato corneo e il farmaco viene rilasciato successivamente da una riserva mediante applicazione di cerotti transdermici.
- **coat and poke**: i microaghi vengono prima rivestiti dal farmaco e solo successivamente inseriti nella pelle; un'applicazione tipica è la somministrazione di vaccini.

In questo contesto si inserisce la tecnologia Macroflux®: consiste nell'applicazione diretta sulla pelle di un sottile strato di titanio che presenta microaghi lunghi 330 µm, con densità di 190 unità/cm<sup>2</sup>, distribuiti su 1 o 2 cm<sup>2</sup> di superficie, sui quali è stato applicato il farmaco (Matriano et al.2002). Questo metodo è risultato efficace nel promuovere la permeazione cutanea di ovalbumina in cavie hairless . Macroflux® è dotato di uno specifico applicatore, ma può anche essere incorporato all'interno di cerotti transdermici a riserva. Lin et al.(2001) hanno testato l'efficacia di Macroflux® per la somministrazione di oligodeossinucleotidi (ODN) nella terapia genica in cavie hairless integrando il dispositivo con un circuito elettrico (ionoforesi): in questo caso un gel contenente ODN era posto all'interno di un anello adesivo con un'area di contatto con la pelle di 2 cm<sup>2</sup>, su cui era applicata una serie di microaghi con densità di 240 unità/cm<sup>2</sup> e lunghezza di 430 µm e l'anello era poi inserito sotto il catodo. L'applicazione contemporanea della ionoforesi e dei microaghi determina un flusso transdermico di ODN 100 volte superiore alla sola ionoforesi.

La variazione di lunghezza dei microaghi da 200 a 400 µm ha dimostrato maggiore tollerabilità dei sistemi a lunghezza inferiore. Macroflux® è stato sfruttato anche per la somministrazione dell'ormone della crescita: rispetto all'iniezione sottocutanea, il picco di concentrazione plasmatica veniva raggiunto con un anticipo di circa 30 minuti e, paragonando i valori di clearance, non si registrava un effetto skin depot.

Sono stati effettuati numerosi studi sostituendo i microaghi solidi con microcapillari. Studi in vivo su ratti diabetici hanno dimostrato che la somministrazione di insulina mediante microcapillari è in grado di modulare i livelli plasmatici di glucosio (McAllester et al. 2003).

Sivamani et al. (2005) hanno dato luogo al primo studio clinico condotto sull'uomo per valutare l'efficienza di microcapillari lunghi 200 µm e con diametro interno di 40 µm. E' stato testato l'assorbimento cutaneo del metil nicotinato, un vasodilatatore dei capillari cutanei superficiali, sottoponendo ciascun volontario a 4 diversi trattamenti: applicazione topica, iniezione con microcapillari ad apice acuto e apertura laterale, iniezione con microcapillari simmetrici con apertura situata all'apice e controllo, applicando una matrice priva di microcapillari. Ogni trattamento era applicato per 30 secondi su una superficie di 1 cm<sup>2</sup> e veniva misurato il flusso sanguigno attraverso i capillari cutanei. Il risultato fu una notevole

diminuzione del tempo necessario a raggiungere il massimo flusso sanguigno con l'applicazione delle 2 tipologie di microcapillari ed un netto aumento della quantità di farmaco veicolato con i microcapillari ad apertura laterale. Questo poteva essere giustificato dal fatto che nei microcapillari simmetrici la regione di penetrazione coincide con il lume del microcapillare mentre nei microcapillari ad apertura laterale il lume è deviato rispetto a tale regione e quindi si crea meno resistenza al flusso. Fenomeno analogo è stato riscontrato da Teo et al. (2006) usando matrici di microcapillari cilindrici per la somministrazione di insulina nell'animale: non c'era un abbassamento dell'indice ematico di glucosio, evidenziato invece con la somministrazione attraverso aghi ipodermici e ciò poteva essere dovuto al fatto che i microcapillari non erano abbastanza taglienti per penetrare attraverso lo strato corneo. In letteratura sono riportati anche alcuni studi condotti su ratti hairless sull'uso dei microcapillari per l'estrazione di sostanze dai liquidi interstiziali cutanei, in particolare glucosio, senza l'uso di dispositivi elettronici. Wang et al.(2006) applicavano una pressione di mezza atmosfera per alcuni minuti per estrarre pochi  $\mu$ l di fluido mentre Mukerjee et al.(2004) sfruttavano l'azione della forza capillare con lo stesso scopo, allungando però i tempi di analisi. Proprio a causa della loro complessità, non sono numerose le ricerche condotte in questa direzione.

## ***6. Metodi per valutare la penetrazione e la permeazione cutanea in vivo e in vitro***

Gli studi di permeazione e penetrazione dei farmaci possono essere condotti *in vivo* seguendo protocolli sperimentali ed *in vitro* mediante celle di diffusione.

Con la sperimentazione *in vitro* è possibile definire la cinetica di permeazione delle sostanze attive attraverso cute isolata eliminando i problemi derivanti dalla farmacocinetica della molecola in esame.

La sperimentazione *in vivo*, invece, permette di quantificare e verificare la biodisponibilità e la tossicità di un farmaco sia a livello topico che sistemico. Generalmente questo tipo di sperimentazione viene limitato, per quanto possibile, a causa degli alti costi e dei problemi etici che può sollevare. I metodi *in vitro*, quindi, pur non sostituendo gli studi *in vivo*, possono essere utili nella fase preformulativa e di sviluppo formulativo

### **6.1. Studi *in vivo***

La sperimentazione di formulazioni topiche può essere effettuata, oltre che sull'uomo, su modelli animali, che costituiscono l'unica alternativa per lo studio *in vivo* di farmaci potenzialmente tossici. I modelli animali che portano a risultati paragonabili a quelli ottenibili sull'uomo sono il "maiale" (Reifenrath et al. 1984), la "scimmia Rhesus" (Wester e Maibach, 1989), il "ratto hairless" (Rougier et al., 1987) ed il "coniglio". L'utilizzo di ciascuno di questi animali presenta in ogni modo alcuni inconvenienti:

- Il maiale ha un'enorme quantità di grasso sottocutaneo, in cui potrebbero accumularsi farmaci lipofili in misura maggiore di quanto non accada nell'uomo, dando risultati falsati
- L'applicazione di un TTS sulla scimmia è limitata alle zone senza pelo (ventre), inoltre, va considerato che lo spessore della cute varia a seconda della localizzazione anatomica.
- La velocità di assorbimento nel ratto, nel coniglio e nel topo sembra notevolmente più grande rispetto all'uomo (Bartek et al., 1972)

Infine è da rilevare che la risposta della pelle animale al trattamento con enhancer risulta notevolmente maggiore (Bond e Barry, 1988).

## 6.2. Studi *in vitro*

Gli studi *in vitro* possono essere condotti su cute umana, cute animale o su cute ricostituita.

La cute umana, difficilmente reperibile, ha un'enorme variabilità da campione a campione, dovuta a differenze di localizzazione anatomica, età, sesso, causa di morte e metodo di conservazione. Rappresenta comunque il metodo più valido per valutare la capacità dei farmaci di penetrare e permeare la cute. I problemi legati alla reperibilità di pelle umana ed alla riproducibilità dei dati ottenuti vengono superati con l'uso di modelli animali, in particolare topi "hairless", ratti, cavie, conigli e maiali. La pelle animale può essere scelta, a seconda delle esigenze sperimentali e delle caratteristiche richieste, non solo in base alla specie ma anche in base all'età ed al sesso. Un aspetto importante dell'impiego dei topi "hairless" nella ricerca scientifica riguarda gli studi di penetrazione cutanea. Il termine "topo hairless" non identifica un unico tipo di animale ma include un folto gruppo di diversi ceppi di varie origini genetiche. E' quindi importante definire con precisione il ceppo di topi utilizzato in uno studio. Le informazioni disponibili sugli studi comparati di penetrazione nell'uomo e nel topo "hairless" sono talvolta contraddittorie: alcune sostanze penetrano in modo quasi analogo mentre altre sostanze differiscono almeno di un ordine logaritmico e la cute umana si rivela meno permeabile (Simon e Maibach, 1998). Negli ultimi anni sono stati molto studiati i tessuti ricostituiti come substrati alternativi all'uso di animali per eseguire test di tossicità, irritazione, sensibilizzazione ed allergenicità cutanea di prodotti cosmetici ed altre formulazioni da applicare topicamente sulla pelle.

Quando una sostanza attiva viene applicata sulla cute mediante opportuno veicolo, si distribuisce prima nei vari strati cutanei e successivamente raggiunge la circolazione sistemica. Talvolta può risultare necessario indagare sulla distribuzione cutanea del farmaco e, a tale scopo, in letteratura vengono riportate varie metodiche:

1. misure di estrazione cutanea da cute intera
  2. sezionamento orizzontale degli strati cutanei
  3. procedura di tape stripping
  4. metodi spettroscopici
1. La determinazione della concentrazione di farmaco nella cute intera prevede la rimozione dell'eccesso di formulazione dalla cute seguita dall'estrazione del farmaco dalla cute digerita con solventi opportuni. Al termine di questa



operazione la quantità di farmaco permeato è determinata analiticamente (Lafforgue et al., 1997). Sebbene questa tecnica sia di facile esecuzione, rapida e poco costosa, non fornisce alcuna informazione sulla localizzazione precisa della sostanza in esame.

2. Il sezionamento orizzontale consiste nella divisione della cute in sezioni dell'ordine di alcune decine di micron tramite criomicrotomo; la quantità di farmaco presente all'interno di ciascuna sezione è determinata usando un'opportuna metodica analitica (Monteiro-Riviere et al., 1993). Dai dati raccolti si possono ottenere le concentrazioni di sostanza attiva presente nella cute in relazione alla profondità e costruire un dettagliato profilo di distribuzione (Wagner et al., 2000; Grundmann-Kollmann et al., 2002).
3. Il tape stripping consiste nell'applicare e rimuovere in successione delle strisce adesive sulla regione di cute trattata con la formulazione. Ogni adesivo rimosso conterrà una quota di strato corneo e la corrispondente quota di principio attivo penetrato fino a quel livello, che potrà essere determinato con opportuna procedura analitica. Dato che formulazioni diverse possono influenzare la porzione di strato corneo rimosso con ogni adesivo, per la quantità di principio attivo rilevato a diversi livelli non si può correlare il numero di stripping con la profondità, ma standardizzare la quantità rilevata con la reale posizione nello strato corneo (Lademann et al. 2009).
4. I metodi spettroscopici usati per quantificare le sostanze attive nella pelle sono diventati importanti grazie allo sviluppo delle strumentazioni ottiche negli ultimi anni. Tra i metodi più usati troviamo la spettroscopia ATR-FTIR (Attenuated Reflectance Fourier Transform Infrared), la spettroscopia di fluorescenza e la spettroscopia fototermica.

# ***BIBLIOGRAFIA***

- **Bal SM, Slutter B, Jiskoot W, Bouwstra A.** Small is beautiful: N-trimethyl chitosan-ovalbumin conjugates for microneedle-based transcutaneous immunisation. *Vaccine* 2011;29:4025-4032.
- **Bartek MJ, La Budde JA e Maibach HI.** Skin permeabilità in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J. Invest. Dermatol.* 1972; 58:114-123.
- **Berzas Nevado JJ, Rodriguez Flores J, Villasenor Lierena MJ, Rodriguez Farinas N.** Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of tartrazine, quinoline Yellow and patent blue V in commercial products. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999;365:383-388.
- **Bond JR e Barry BW.** Hairless mouse skin limited as model for assessing the effects of penetration enhancer in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1988;90: 810-813.
- **Bramson J, Dayball K, Eveleigh C, Wan YH, Page D, Smith A.** Enabling topical immunization via microporation: a novel method for pain free and needle-free delivery of adenovirus-based vaccines. *Gene Ther* 2003; 10:251-260.
- **Buur JL, Baynes RE, Yeatts JL, Davidson G, DeFrancesco TC.** Analysis of diltiazem in Lipoderm® transdermal gel using reversed-phase high-performance liquid chromatography applied to homogenization and stability studies. *J. Pharm. Bio. Anal.* 2005;38:60-65.
- **Chabri F, Bouris K, Jones T, Barrow D, Hann A, Allender C, Brain K, Birchall J.** Microfabricated microneedles for nonviral cutaneous gene delivery. *Br. J. Dermatol* 2004; 150:869-877.
- **Chandrashekar NS, Hiremath SRR.** Transdermal delivery of 5-fluorouracil for induced Ehrlich ascites carcinoma tumor in Balb/c mice and pharmacokinetic study. *Recent Patents Anti-Canc Drug Discov* 2007;2:235-239
- **Chandrashekar NS, Prasanth VV.** Clinical evaluation of 5-fluorouracil from transdermal patches on EAC and DLA cell-induced tumors in mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 2008;9:437-440.
- **Christophers E., Sterry W.** *Psoriasis*; in Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg-hill, app.489-514, 1993.

- **Davis SP, Landis BJ, Adams ZH, Allen MG, Prausnitz MR.** Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *J. Bio.* 2004; 37:1155-1163.
- **Denet AR, Vanbever R, Preat V.** Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:659-674.
- **Diembeck W., Eskes C., Heylings J.R., Langley G., Rogiers V., Van de Sandt J.J., Zuang V.,** Skin absorption and penetration, *Alter. Lab. Anim.* 2005; 1:105-107.
- **Donnelly RF, Majithiya R, Singh TRR, Morrow J, Garland MJ, Demir YK, Migalska K, Ryan E. Gillen D, Scott CJ, Woolfson AD.** Design, Optimization, and characterisation of polymeric microneedle arrays prepared by a novel laser-based micromoulding technique. *Pharm. Res.* 2011; 28:41-57.
- **Donnelly RF, Singh TRR, Tunney MM, Morrow DIJ, McCarron PA, O'Mahony C, Woolfson AD** Microneedle arrays allow lower microbial penetration than hypodermic needles in vitro. *Pharm. Res.* 2009;26:2513-2522.
- **Elias P.M.,** Epidermal lipids, membranes and keratinization . *Int. J. Dermatol.* 1981;20:1
- **Elias P.M.,** Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *Int. J. Dermatol.* 1983;80:445
- **Elias P.M., Goerke J., Friend DS.** Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J. Invest. Dermatol.* 1977; 69:535
- **E. Touitou** Expert Opin.Biol. Th. 2, 723-733 (2002).
- **Fesce R., Fumagalli G.,** *Farmacocinetica* da: Farmacologia Molecolare e cellulare, Clementi e Fumagalli, UTE.
- **Flynn G.L.,** Mechanism of percutaneous absorption from physicochemical evidence, in *Percutaneous Absorption*, Bronaugh R.L., e Maibach H.I., ed. Marcel Dekker, N.Y., 17-42, 1985.
- **Folvari M, Babiuk S, Badea I.** DNA delivery for vaccination and therapeutics through the skin. *Curr Drug Deliv* 2006;3:17-28.
- **Gosline J, Lillie M, Carrington E, Guerrette P, Ortlepp C, Savage K.** Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2002;357:121-132.

- **Grundmann-Kollmann M, Podda M, Brautigam L, Hardt-Weinelt K, Ludwig RJ, Geisslinger G, Kaufmann R, Tegeder I.** Spatial distribution of 8-methoxypsoralen penetration into human skin after systemic or topical administration. *J. Clin. Pharmacol.* 2002; 54:535-539.
- **Gummer C, Hinz R, Maibach H.** The skin penetration cell: a design update. *Int. J. Pharm.* 1987; 40:101-104.
- **Gupta J, Andrews S, Gill HS, Prausnitz MR.** Kinetics of skin resealing after insertion of microneedles in human subjects. New York: *Controlled Release society Annual Meeting*; 2008.
- **Hadgraft J, Peck J, Williams DG, Pugh WJ, Allan G.** Mechanism of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. *Int. J. Pharm.* 1996; 141:17-25.
- **Henry S, McAllister DV, Allen MG, Prausnitz MR.** Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 1998; 87:922-925.
- **Herndon TO, Gonzalez S, Gowrishankar T, Anderson RR, Weaver JC.** Transdermal microconduits by microcission for drug delivery and sample acquisition. *BMC Med* 2004; 2:12
- **Higuchi T.** Design of chemical structure for optimal dermal delivery, *Curr. Probl. Dermatol.*, 1978; 7:121.
- **Jacobi U, Tassopoulos T, Surber C, Lademann J.** Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch. Dermatol. Res.* 2006; 297:303-310.
- **Jampilek J, Brychtova K.** Azone Analogues: Classification, Design, and Transdermal Penetration Principles. *Medicinal Research Reviews 2010 Wiley Periodicals* .
- **Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH.** Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:619-658.
- **Kalluri H, Banga AK.** Formation and closure of Microchannels in skin following microporation. *Pharm. Res.* 2011; 28:82-94.
- **Karande P, Jain A, Ergun K, Kispersky V, Mitragotry S.** Design Principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *PNAS* 2005; 102:4688-4693.

- **Karande P, Jain A, Ergun K, Kispersky V, Mitragotri S.** Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc. Natl. Acad Sci Usa* 2005; 102:4688-4693.
- **Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA.** Elastic fibres. *J. Cell. Sci.* 2002;115:2817-2828.
- **Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW.** The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eu. J. Pharm.and Biopharm.* 2009; 72:317-323.
- **Lafforgue C, Carret L, Falson F, Reverdy ME, Freney J.** Percutaneous absorption of a chlorexidine digluconate solution. *Int. J. Pharm* 1997;147:243-246.
- **Langer R.** Drug delivery and targeting. *Nature* 1998; 392:5-10.
- **Lee KC, Chen JJ.** Transdermal Selegiline for the treatment of major depressive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2007;3:527-537.
- **Lee JW, Park JH, Prausnitz MR.** Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials*, 2008; 29:2113-2124.
- **Levi G, Gershonowitz A, Sacks H, Stern M, Sherman A, Rudaev S, Zivin I, Phillip M.** Transdermal delivery of human growth hormone through RF-microchannels. *Pharm Res* 2005;22:550-555
- **Li G, Badkar A, Kallury H, Banga AK.** Microchannels created by sugar and metal microneedles: characterization by microscopi, macromolecular flux and other techniques. *J. Pharm. Sci.* 2010; 99:1931-1941.
- **Lin W, Cormier M, Samiee A, Griffin A, Johnson B, Teng CL, Hardee GE, Daddona PE.** Transdermal delivery of antisense oligonucleotidi with microprojection patch (Macroflux) technology. *Pharm.Res.* 2001; 18(12):1789-1793.
- **Machet L., Boucaud A.,** Phonophoresis: efficiency, mechanism, and skin tolerance. *Int J Pharm* 2002; 243:1-15.
- **Marriot C., Edwardson P.A.D e Hollingsbee D.A.** The effect of dermatological patch on stratum corneum hidration and percutaneous absorption, Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., *Controlled Release Society, Inc.*, 19,460-61, 1992.

- **Martano W, Davis SP, Holiday N, Wang J, Gill.H, Prausnitz MR.** Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo. *Pharm. Res.* 2004; 21:947-952.
- **Marty JP.** NMF and cosmetology of cutaneous hydration. *Ann Dermatol Venereol.* 2002; 129(1 Pt 2):131-6.
- **McAllister DV, Wang PM, Davis SP, Park JH, Canatella PJ, Allen MG, Prausnitz MR.** Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication, methods and transport studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003;100:13755-13760
- **Matriano JA, Cormier M, Johnson J, Young WA, Buttery M, Nyam K, Daddona PE.** Macroflux microprojection array patch technology: a new and efficient approach for intracutaneous immunization. *Pharm. Res.* 2002;19(1):63-70.
- **Megill WM, Gosline JM, Blake RW.** The modulus of elasticity of fibrillin-containing elastic fibres in the mesoglea of the hydromedusa *Polyorchis penicillatus*. *J. Exp. Biol.* 2005;208:3819-3834
- **Menon GK, Lee SH, Roberts MS.** Ultrastructural effects of some solvent and vehicles on the stratum corneum and other skin components: Evidence for an “extended mosaic- partitioning model of the skin barrier”. In Roberts MS, Walters KA, editors. *Dermal absorption and toxicity assessment.* New York: Mercel Dekker; 1998. pp 727-751.
- **Michaels A.S. ,Chandrasekaran SK, Shaw JE. Amer. I. Chem. Eng. J.** 21, 985, 1985.
- **Middleton J.D.** The mechanism of water binding in stratum corneum. *Br J Dermatol* 1986; 80:437-450.
- **J.A. Mikszta, J.B. Alarcon, J.M. Brittingham, D.E. Sutter, R.J. Pettis, N.G. Harvey.** Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin barrier function and targeted epidermal delivery. *Nat. Med.* 2002; 8 415-419.
- **Moller HJ, Hampel H, Hegerl U, Schmitt W, Walter K.** Double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on the efficacy and tolerability of a physostigmine patch in patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Pharmacopsychiatry* 1999;32:99-106.

- **Monteiro-Riviere, Inman AO, Riviere JE, McNeil SC, Francoeur ML.** Topical penetration of piroxicam is dependent on the distribution of the local cutaneous vasculature. *Pharm. Res.* 1993; 10:1326-1331.
- **Monti D, Giannelli R, Chetoni P, Buralassi S.** Comparison of the effect of ultrasound and of chemical enhancers on transdermal permeation of caffeine and morphine through hairless mouse skin in vitro. *Int. J. Pharm.* 2001;229:131-137.
- **Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH.** Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; 52:103-112.
- **Mukerjee E, Collins SD, Isseroff RR, Smith RL.** Microneedle array for transdermal biological fluid extraction and in-situ analysis. Sensor and actuators A-Physical 2004; 114:267-275.
- **Muller W, Peck JV.** Transdermal therapeutic system for treating parkinsonism. *U.S. Patent* 7,413,747;2008.
- **Ogura M, Paliwal S, Mitragotri S.** Low-frequency sonophoresis: Current Status and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008.
- **Ongipattanakul B, Burnette RR, Potts RO, Francoeur ML.** Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharm Res* 1991; 8:350-354.
- **Paliwal S, Menon GK, Mitragotri S.** Low-Frequency sonophoresis: ultrastructural basis for stratum corneum permeability assessed using quantum dots. *J Invest Dermatol* 2006; 126:1095-1101.
- **Park JH, Allen MG, Prausnitz MR.** Biodegradable polymer microneedles: fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. *J. Contr. Rel.* 2005; 104:51-66
- **Parrish J.A.** The response of skin to visible and ultraviolet radiation; in Goldsmith A. (ed). *Biochemistry and Physiology of the skin.* Oxford university Press, pp. 713-733, 1983.
- **Potts R.L.,** Physical characterization of stratum corneum, *Transdermal Drug Delivery, Development Issues and Research Initiatives*, Hadgraft J. e Guy R.H., Ed. Marcel Dekker, N.Y., cap.2, 1989.

- **Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R.** Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:115-124.
- **Prausnitz MR.** Overcoming skin's barrier: the search for effective and user-friendly drug delivery. *Diab Technol Ther* 2001; 3:233-236.
- **Prausnitz MR.** Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:581-587.
- **Prausnitz MR, Langer R.** Transdermal drug delivery. *Nat Biotech.* 2008; 26:1261-1268.
- **Prausnitz MR, Gill HS, Park JH.** Modified release Drug Delivery. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME., editors. New York: *Informa Healthcare*; 2008.
- **Rawlings A.V., Harding C.R.** Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther.* 2004;17 *Suppl 1*:43-8. *Review.*
- **Reifenrath WG, Chellquist EM, Shipwash EA, Jedberg WW, Krueger GG.** Percutaneous penetration in the hairless dogweanling pig and the grafted athymic nude mouse: Evaluation of models for predicting skin penetration in man. *Br. J. Dermatol* 1984;111 (*Suppl.27*):123-135.
- **Rougier A., Rallis M., Krien P., Lotte C.** In vivo percutaneous absorption: a key role for stratum corneum/vehicle partitioning. *Arch Dermatol Res.* 1990; 282(8):498-505.
- **Rougier A, Lotte C e Maibach HI.** The airless rat: a relevant animal model to predict in vivopercutaneous absorption in humans. *J. Invest. Dermatol.* 1987;88:577-581.
- **Scarpignato S.** Principi di farmacologia cutanea. In: Serri F., Giannetti A., Trattato di dermatologia *Vol I. Piccin ed.* 2001.
- **Scheuplein R.J. e Blank I.J.** Permeability of the skin, *Physiol. Rev.* 1971; 51:702.
- **Sherratt MJ, Baldock C, Haston JL, Holmes DF, Jones CJP, Shuttleworth CA, Wess TJ, Kielty CM.** Fibrillin microfibrils are stiff reinforcing fibres in compliant tissues. *J. Mol. Biol.* 2003; 332:183-193.
- **Sherratt MJ.** Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *AGE.* 2009; 31: 305-325.



- **Simon GA, Maibach HI.** Relevance of hairless mouse as an experimental model of percutaneous penetration in man. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 1998;11 (2):80-86.
- **Sivamani RK, Stoeber B, Wu GC, Zhai H, Liepmann D, Maibach H.** Clinical microneedle injection of methyl nicotinate: stratum corneum penetration. *Skin Res Technol* 2005; 11(2):152-156.
- **Stoughton R.B.,** Percutaneous absorption of drugs, *Annu. Rev. Pharm. Toxicol* 1989; 29:55.
- **Sweeney T.M. e Downing D.T.,** Role of lipids in epidermal barrier to water diffusion, *J. Invest. Dermatol.,* 1970; 55:135.
- **Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W.** Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 2005; 125:264-269.
- **Teo AL, Shearwood C, Ng KC, Lu J, Moochhala S.** Transdermal microneedles for drug delivery applications. *Materials science and engineering B-Solid state materials for advanced technology.* 2006;132:151-154.
- **Verbaan FJ, Bal SM, Van den Berg DJ, Dijksman JA, Hecke MV, Verpoorten H, Van den Berg A, Luttge R, Bouwstra JA.** Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method. *J. Control, Rel.* 2008;128:80-88.
- **Wagner H, Kostka KH, Lehr KM, Schaefer UF.** Drug distribution in human skin using two different in vitro test system: comparison with in vivo data. *Pharm.Res.* 2000; 17:1475-1481.
- **Wang PM, Cornwell M, Hill J, Prausnitz MR.** Precise Microinjection into Skin Using Hollow Microneedles. *Journal of investigative dermatology.* 2006; 126:1080-1087
- **Wester RC, Maibach HI.** “In vivo” animal models for percutaneous absorption, In Bronaugh RL e Maibach HI (Eds), *Percutaneous absorption mechanism-methodology drugs delivery* 1989. *Mercel Dekker, New York, pp* 221-238.
- **Williams AC, Barry BW.** Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:603-618.
- **Williams M.L.** Ichtyosys: Mechanism of disease 9:365-368, 1992.

- **Wong TW.** Chitosan and its use in design of insulin delivery system. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2009;3:8-25.
- **Wu Y, Qiu Y, Zhang S, Qin G, Gao Y.** Microneedles-based drug delivery: studies on delivery parameters and biocompatibility. *Bio. Microdevices.* 2008; 10:601-610.
- **Yan G, Warner KS, Zhang J, Sharma S, Gale BK.** Evaluation needle length and density of microneedle arrays in the pretreatment of skin for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2010;391:7-12.

